菜青虫感染玫烟色拟青霉后血淋巴蛋白质含量及几种保护酶活力的变化

张仙红, 王宏民, 李文英, 贺运春, 郝　赤*

(山西农业大学农学院, 山西太谷　030801)

摘要: **对玫烟色拟青霉 *Paecilomyces fumosoroseus* 侵染 3、4 龄菜青虫 *Pieris rapae* 后,其血淋巴中蛋白质含量、体内保护酶及谷胱甘肽 S-转移酶活力进行了研究。结果表明,感病的 3、4 龄菜青虫血淋巴中蛋白质含量明显低于同期未感染的幼虫 感病虫体内超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶的活力发生了不同程度的改变,其中对 3 龄菜青虫体内酶活力的影响比 4 龄幼虫大。此外被侵染的 3、4 龄菜青虫体内谷胱甘肽 S-转移酶活力在感病前期显著高于同期未感染的菜青虫,而在感病后期明显低于同期未感染的菜青虫。**

关键词: **菜青虫; 玫烟色拟青霉; 病理; 蛋白质含量; 保护酶; 谷胱甘肽 S-转移酶**

中图分类号: Q965.8　　文献标识码: A　　文章编号: 0454-6296(2006)02-0230-05

Changes in the protein content in haemolymph and activities of protective enzymes of *Pieris rapae* infected by *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes)

ZHANG Xian-Hong, WANG Hong-Min, LI Wen-Ying, HE Yun-Chun, HAO Chi* (College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: Changes in the protein content in haemolymph and activities of protective enzymes of *Pieris rapae* infected by *Paecilomyces fumosoroseus* were assayed. The results indicated that the protein content in haemolymph of the 3rd and 4th instar larvae of the *P. rapae* infected by *P. fumosoroseus* decreased obviously. The SOD, POD and CAT activity of the infected *P. rapae* was significantly lower than that of the control not infected. The effect on the 3rd instar larvae of *P. rapae* was more obvious than on the 4th instar. In addition, the GSTs activity of the 3rd and 4th instar larvae of *P. rapae* was higher in the early period of infection, but was lower in the late period of infection than that of the healthy *P. rapae* in the corresponding period.

Key words: *Pieris rapae*; *Paecilomyces fumosoroseus*; pathogenesis; protein content; protective enzymes; GSTs

玫烟色拟青霉 *Paecilomyces fumosoroseus* 像大多数昆虫病原真菌一样,需菌丝穿透体壁才能侵染寄主。进入血腔中的菌丝,会遇到昆虫防御系统的抵抗,即被感染昆虫受到刺激后所产生的应激反应,也就是生物体接受刺激后引起的一系列代谢变化。在有氧生物圈内,氧化应激是机体经常遇到的一种应激反应。因为所有需氧生物的生理过程均有自由基的产生与消除,且两者之间存在平衡,若失去平衡,便会损伤机体引起病变(李毅平和龚和,1998)。昆虫的生命周期短,但昆虫更易受氧胁迫。若进入血腔中的菌丝战胜了寄主的防御系统,便在血腔中大量繁殖,从而引起寄主的一系列生理病理变化。

李周直等(1994)报道,菜青虫 *Pieris rapae* 体内存在着超氧化物歧化酶(superoxide,SOD)、过氧化氢酶(catalase,CAT)和过氧化物酶(peroxidase,POD)等保护酶。当菜青虫被感染后,一定会启动机体内的保护酶系统进行防御,即存在于昆虫体内的 SOD、CAT 和 POD 三者协同作用,使自由基保持在一个较

基金项目: 山西省科技攻关项目(041016)

作者简介: 张仙红,女,1966 年生,博士,副教授,从事昆虫病理学研究,E-mail: zxh6288@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: haochi@sxau.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-09-23; 接受日期 Accepted: 2005-12-02

低的水平，从而维持昆虫体内正常的生理活动。近年来，有关昆虫保护酶的研究报道很多，但多数集中在昆虫保护酶与化学农药抗性之间的研究（李周直等，1994；吴小锋等，1998；陈尚文，2001；刘玉娣和赵士熙，2002）。有关病原微生物侵染与昆虫保护酶之间的研究报道还很少，仅张军等（2003）对家蚕 *Bombyx mori* 感染蛹虫草后、宋漳等（2002）对马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 感染绿僵菌后，体内的蛋白质含量与保护酶的变化进行了研究。有关菜青虫感染病原微生物的研究目前还未见报道。此外昆虫体内的脂肪体是真菌菌丝寄生的重要场所，因此当病原微生物侵入昆虫体后，存在于昆虫脂肪体内的谷胱甘肽 S-转移酶（glutathione S-transferases，GSTs）的活力也必然会受到影响。为了解玫烟色拟青霉对昆虫的致病机理，我们研究了感病菜青虫体内抗氧化酶系和谷胱甘肽 S-转移酶的活力变化，旨在为研究玫烟色拟青霉的侵染和致病机制提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试菌株和虫源

菌株：玫烟色拟青霉 PF9606。虫源：室内饲养的 3、4 龄菜青虫。

1.2　接菌方法

将供试的 3、4 龄菜青虫放入垫有滤纸的抽滤漏斗中，每次虫体定量，再倒入定量的孢子悬浮液（每毫升含 2×10^7 个孢子），并立即抽滤。然后挑选健康菜青虫放入罐头瓶中，纱布封口，于人工气候箱中进行饲养。人工气候箱 7：00～19：00 保持光照，19：00 到次日 7：00 保持黑暗，温度 22℃，相对湿度 90%。接菌后第 2、3、4、5、6 天测定虫体内 CAT、POD、SOD 和 GSTs 活力的变化；以 0.1% 吐温-80 无菌水处理作为对照。每处理 30 头幼虫，重复 3 次。

1.3　蛋白质含量测定

蛋白含量的测定方法采用考马斯亮蓝 G-250 法（西北农业大学，1986）。从 3、4 龄菜青虫接菌第 2 天开始，每 24 h 取 5 头菜青虫，在冰浴条件下，剪开菜青虫腹足收集血淋巴于离心管中（提前冷冻且加入少许苯基硫脲），然后在 4℃、3 000 r/min 离心 3 min，除去血细胞备用。

1.4　保护酶活力测定方法

1.4.1　酶液制备：将供试幼虫 30 头置于预冷的研钵中，加入 3 mL 0.005 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 7.0，磷酸缓冲液和菜青虫幼虫体内 pH 值约相等）和 1 滴苯基硫脲，在冰浴中匀浆，匀浆液置于 Sigma 冷冻离心机于 0℃、6 000 r/min 离心 20 min，取上清液作为酶液。

1.4.2　SOD 酶活力测定：采用 Beauchamp 和 Fridovice（1971）方法测定。

1.4.3　POD 酶活力测定：采用愈创木酚法测定。

1.4.4　CAT 酶活力测定：采用 Stellmach（1992）方法测定。

1.5　谷胱甘肽 S-转移酶活力测定

采用慕立义（1994）方法测定。

2　结果与分析

2.1　菜青虫体内蛋白质含量的变化

3 龄菜青虫血淋巴中蛋白质含量的变化如图 1（A）所示。健康的 3 龄菜青虫随虫体的生长发育，血淋巴中蛋白质含量在龄中呈增长趋势，在龄末有所下降；处理组菜青虫血淋巴中蛋白质含量的变化趋势同健康菜青虫的变化趋势相同，但从接菌的第 2 天开始就显著低于对照，即处理后第 2 天，正常 3 龄菜青虫血淋巴中蛋白质含量为 34.6 mg/mL，而处理组的为 25.6 mg/mL，且直到 3 龄末仍显著低于对照。

4 龄菜青虫血淋巴中蛋白质含量呈波浪式变化，且对照组和接菌组的变化趋势基本一致（图 1：B）。但从接菌的第 3 天开始，处理组菜青虫血淋巴中蛋白质含量开始低于对照组，如对照组血淋巴中蛋白质含量为 34.0 mg/mL，而处理组为 31.2 mg/mL，随接菌时间延长，蛋白质含量一直低于对照。

从 3、4 龄菜青虫血淋巴中蛋白质含量的变化可知，玫烟色拟青霉不论侵染 3 龄还是 4 龄菜青虫均造成虫体血淋巴中蛋白质含量降低。3 龄菜青虫从接菌后第 2 天开始，4 龄菜青虫从接菌第 3 天开始，血淋巴中蛋白质含量显著低于对照，可见 3 龄菜青虫比 4 龄菜青虫受玫烟色拟青霉侵染的影响更大，即 4 龄菜青虫对昆虫病原真菌入侵的防御能力要好于 3 龄菜青虫。

2.2　菜青虫体内保护酶系活力变化

2.2.1　菜青虫体内 SOD 活力变化：经玫烟色拟青霉处理和未处理的 3、4 龄菜青虫体内 SOD 活力变化如图 2 所示。3 龄菜青虫从接菌第 3 天开始，SOD 活力呈下降趋势且明显低于对照，可见 3 龄菜青虫自身防卫能力比较差，不能及时对外界的侵染给予抵抗；而 4 龄菜青虫在接菌后的 2～4 天，其体内的

SOD 活力均明显高于对照，这表明在接菌后第 2 天，4 龄菜青虫体内的 SOD 活力迅速提高，以减轻过氧离子对虫体的毒害。但接菌后第 5 天，由于玫烟色拟青霉在菜青虫体内的大量繁殖，SOD 的合成受到抑制，自身的防卫能力迅速下降，因而在感病后期的 SOD 活力低于健康的菜青虫。

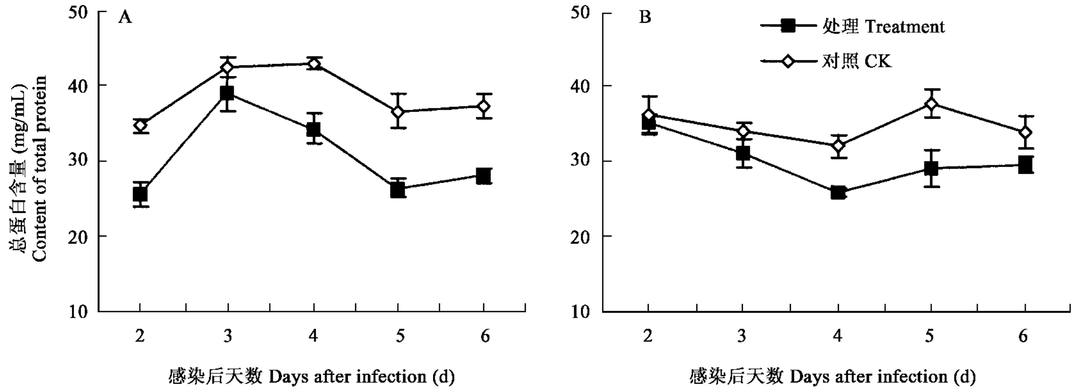

图 1 感染玫烟色拟青霉后 3 龄(A)和 4 龄(B)菜青虫体内蛋白质含量的变化

Fig. 1 Change of the protein content in haemolym of 3rd (A) and 4th (B) instar of *Pieris rapae* infected by *Paecilomyces fumosoroseus*

图中数据为平均值 ± 标准误，下同 The data in the Fig.1 are mean ± *SE*. The same below.

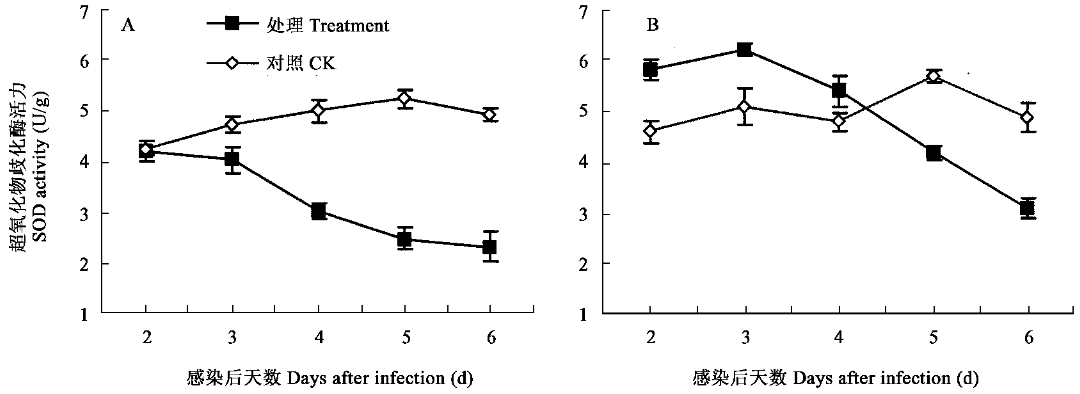

图 2 感染玫烟色拟青霉后 3 龄(A)和 4 龄(B)菜青虫体内超氧化物歧化酶活力的变化

Fig. 2 Change of the SOD activity of 3rd (A) and 4th (B) instar of *Pieris rapae* infected by *Paecilomyces fumosoroseus*

2.2.2 菜青虫 POD 活力变化：对健康 3 龄菜青虫与接菌后 3 龄菜青虫 POD 活力进行比较(图 3：A)，结果表明，接菌后第 2 天，两者的酶活力基本一致，而在接菌后第 3 天，处理组的 POD 活力明显高于对照组；而 4 龄菜青虫体内 POD 活力(图 3：B)在接菌后的第 2～4 天，其活力明显高于对照。由此可知玫烟色拟青霉侵染菜青虫后产生有毒的氧化物质，受侵虫体启动免疫系统合成 POD，因而表现为 POD 活力提高，以维持虫体正常的生理功能。

从 3、4 龄菜青虫体内 POD 活力的变化可知，3 龄菜青虫在接菌后头 3 天，4 龄菜青虫在接菌后头 4 天，其体内 POD 活力明显的高于对照组，可见 4 龄菜青虫比 3 龄菜青虫抵御过氧离子毒害的能力强，即 4 龄幼虫比 3 龄菜青虫的抗逆性强，这与我们生物测定的结果是一致的。

2.2.3 菜青虫体内 CAT 活力变化：3 龄菜青虫 CAT 活力变化见图 4(A)。3 龄菜青虫接菌后第 2～3 天，处理组和对照组之间的 CAT 活力基本一致，但随虫体的长大，对照组 CAT 活力呈缓慢上升趋势，而处理组 CAT 活力呈下降趋势；且在接菌后第 4～6 天，处理组 CAT 活力明显低于对照。

4 龄菜青虫经玫烟色拟青霉处理后，CAT 活力变化见图 4(B)所示。4 龄菜青虫在接菌玫烟色拟青霉后的第 2 天，其体内 CAT 活力与对照没有明显差异，从处理后第 3 天开始，CAT 活力明显高于对照，即处理组菜青虫由接菌第 2 天的 12.3 U/g 提高到第 4 天的 16.2 U/g，显著高于对照。

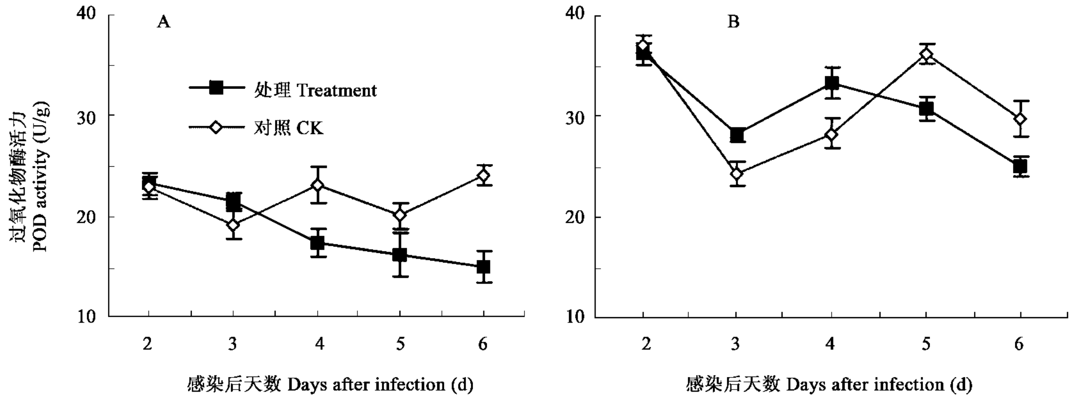

图 3　感染玫烟色拟青霉后 3 龄(A)和 4 龄(B)菜青虫体内过氧化物酶活力的变化

Fig. 3　Change of the POD activity of 3rd (A) and 4th (B) instar of *Pieris rapae* infected by *Paecilomyces fumosoroseus*

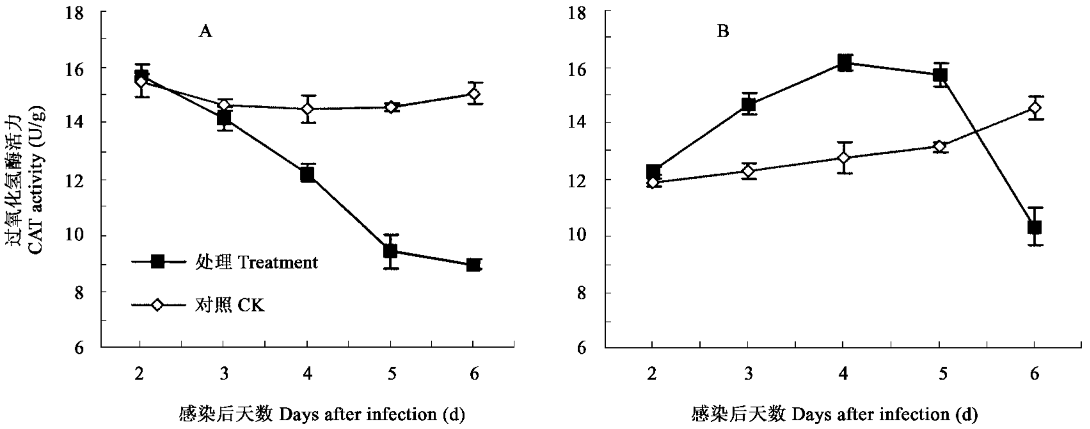

图 4　感染玫烟色拟青霉后 3 龄(A)和 4 龄(B)菜青虫体内过氧化氢酶活力的变化

Fig. 4　Change of the CAT activity of 3rd (A) and 4th (B) instar of *Pieris rapae* infected by *Paecilomyces fumosoroseus*

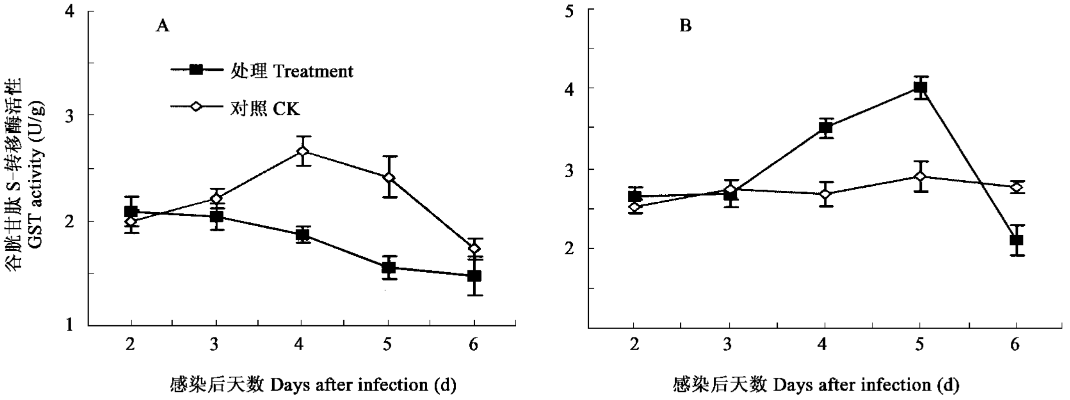

图 5　感染玫烟色拟青霉后 3 龄(A)和 4 龄(B)菜青虫体内谷胱甘肽 S-转移酶活力的变化

Fig. 5　Change of the GST activity of 3rd (A) and 4th (B) instar of *Pieris rapae* infected by *Paecilomyces fumosoroseus*

从以上结果可知，3、4 龄菜青虫被玫烟色拟青霉感染后，体内过氧化氢酶活力的变化不太一致。3 龄菜青虫被感染初期，体内 CAT 活力与对照酶活力无显著差异；4 龄菜青虫在感病初期，其体内 CAT 活力迅速提高以消除毒害的影响，但在感病后期，由于虫体组织和物质代谢受到严重破坏，因而 3、4 龄菜青虫的酶活力均显著低于对照。

2.3　菜青虫谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)活力变化

3 龄菜青虫谷胱甘肽 S-转移酶活力变化见图 5(A)。在接菌第 2 天，处理组和对照组的谷胱甘肽 S-

转移酶活力没有明显差异,但从接菌的第 3 天开始,处理组的谷胱甘肽 S-转移酶活力明显低于对照组,可见玫烟色拟青霉的侵染对 3 龄菜青虫体内谷胱甘肽 S-转移酶活力有明显的抑制作用。

健康的 4 龄菜青虫谷胱甘肽-S-转移酶活力随虫体的生长发育没有明显变化(图 5:B),但处理组在接菌后的不同时间,GSTs 的活力变化较大(图 5:B)。接菌后 2~3 天,4 龄菜青虫谷胱甘肽 S-转移酶的活力与对照相比,没有显著差异;但在接菌后的 4~5 天,其活力明显高于对照。这表明玫烟色拟青霉在感染初期,脂肪体和中肠还未受到侵染,因而 GSTs 的活力没有发生大的改变;但进入侵染后期,脂肪体被侵染,因而存在于脂肪体内的谷胱甘肽 S-转移酶活力提高来抵御外界的破坏,所以在接菌后的 4~5 天,谷胱甘肽 S-转移酶的活力显著高于对照。

3 讨论

据李毅平和龚和(1998)报道,所有需氧生物的生理过程均有自由基的产生和清除,且两者之间存在平衡,若失去平衡,便会损伤机体引起病变。其失衡的原因一是自由基增多,二是机体对自由基的清除能力减弱或两者兼而有之。我们的实验结果表明,4 龄菜青虫被玫烟色拟青霉侵染后,其机体内最重要的清除自由基的 SOD 活力迅速提高,可见被感染的菜青虫体内自由基一定增多。但在接菌第 5~6 天,4 龄菜青虫 SOD 活力急剧下降且显著低于对照,并表现出明显的感病症状,这可能是由于玫烟色拟青霉在菜青虫体内的大量繁殖,其自身的防卫能力迅速下降,SOD 的合成受到抑制,因而对机体内自由基的清除能力减弱,从而引起昆虫发病甚至死亡;也可能是由于感病菜青虫体内自由基的增多,使菜青虫体内自由基的产生和清除之间失去了平衡,因而损伤了菜青虫机体,从而使 SOD 活力急剧下降。以上只是我们根据 SOD 在感病菜青虫体内的一些变化所做的推测,究其原因还有待于深入研究。此外 3、4 龄菜青虫由于受玫烟色拟青霉的侵染,其机体内 CAT、POD 活力均表现出升高或降低的趋势,可见昆虫保护酶系统与昆虫病原真菌对宿主的侵染存在一定的相关性,但其作用机制需进一步的研究探索。

谷胱甘肽 S-转移酶在动物组织体内广泛存在,是一类重要的解毒酶,它能参与许多分子的解毒机制,并可转运一些重要的亲脂化合物,在保护组织以抵御氧化侵害及氧化压力中起重要作用(张红英等,2002)。本研究结果表明,菜青虫在感病初期,体内 GSTs 活力明显提高,以消除毒害的影响,而在感病后期其活力低于对照,可见玫烟色拟青霉的侵染对菜青虫体内的解毒酶存在一定的影响,并在侵染后期抑制了解毒酶的合成。

参考文献(References)

Beauchamp CO, Fridovich I, 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anle. Biochem.*, 44: 276–287.

Chen SW, 2001. Correlation of catalase and peroxidase with pesticide tolerance in massonpine caterpillar. *Acta Entomol. Sin.*, 44(1): 9–14. [陈尚文, 2001. 马尾松毛虫过氧化氢酶及过氧化物酶与耐药性的关系. 昆虫学报, 44(1): 9–14]

Li YP, Gong H, 1998. The progress of antioxidant eneyme systems in insect body. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 10(5): 240–243. [李毅平, 龚和, 1998. 昆虫体内抗氧化系统研究进展. 生命科学, 10(5): 240–243]

Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. A study on activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomol. Sin.*, 37(4): 399–403. [李周直,沈惠娟,蒋巧根, 嵇保中,1994. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究. 昆虫学报, 37(4): 399–403]

Liu YD, Zhao SX, 2002. Correlation of catalase and peroxidase to pesticide tolerance in diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University*, 31(3): 304–307. [刘玉娣,赵士熙,2002. 小菜蛾过氧化氢酶和过氧化物酶与耐药性的关系. 福建农林大学学报,31(3): 304–307]

Mu LY, 1994. Methods for Studying Plant Chemistry and Protection. Beijing: China Agriculture Press. [慕立义,1994. 植物化学保护研究方法. 北京:农业出版社]

Northwest Agricultural University, 1986. Guide for Basic Biochemistry Experiment. Xi'an: Shaanxi Scientech Press. 66–68. [西北农业大学,1986. 基础生物化学实验指导. 西安:陕西科学技术出版社. 66–68]

Song Z, Feng LZ, Jing Y, 2002. Changes of some biochemical estimates in the hemolymph and body wall of *Dendrolimus punctatus* infected by *Metarhizium anisopline*. *Entomological Knowledge*, 39(4): 297–300. [宋漳,冯丽贞,景云,2002. 马尾松毛虫感染绿僵菌后某些生化指标的变化. 昆虫知识, 39(4): 297–300]

Stellmach B (Translated by Qian JY), 1992. Bestimmungsmethoden Enzyme. Beijing: China Light Industry Press. 186–287. [Stellmach B (钱嘉渊 译), 1992. 酶的测定方法. 北京:中国轻工业出版社. 186–287]

Wu XF, Xu JL, Cui WZ, 1998. The activity of catalase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* (L.) and its relation to larval resistance. *Acta Entomol. Sin.*, 41(2): 124–129. [吴小锋,徐俊良,崔为正, 1998. 家蚕血液过氧化氢酶活力及其与蚕体可逆性的关系. 昆虫学报, 41(2): 124–129]

Zhang HY, Chi GT, Zhang JL, 2002. The progress of detoxification eneyme systems and resistance of insecticide. *Jouranl of Agricultural University of Hebei*, 25 (Suppl.): 192–195. [张红英,赤国彤,张金林,2002. 昆虫解毒酶系与抗药性研究进展. 河北农业大学学报, 25(增刊): 192–195]

Zhang J, Song DL, Chen JX, 2003. Physiological and biochemical changes of the silkworm, *Bombyx mori* infected by *Cordyceps militaris*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(6): 674–678. [张军,宋敦伦,陈建新,2003. 家蚕感染蛹虫草后生理生化变化. 昆虫学报, 46(6): 674–678]

(责任编辑:黄玲巧)